植 物 分 类 学 报 35(5):385～395(1997)
Acta Phytotaxonomica Sinica

用核糖体 DNA 的 ITS 序列探讨裂叶沙参的系统位置——兼论 ITS 片段在沙参属系统学研究中的价值*

[1]葛 颂 [2]B. A. Schaal [1]洪德元

[1](中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室，北京 100093)

[2](美国华盛顿大学生物系，圣路易斯，密苏里 63130-4899)

A REEVALUATION OF THE STATUS OF *A. LOBOPHYLLA* BASED ON ITS SEQUENCE, WITH REFERENCE TO THE UTILITY OF ITS SEQUENCE IN *ADENOPHORA*

[1]Ge Song [2]B. A. Schaal [1]Hong De-yuan

[1](*Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093, China)

[2](*Department of Biology, Washington University, St. Louis*, Missouri 63130-4899, USA)

Abstract *Adenophora* Fisch. (Campanulaceae) is a medium-sized and diverse genus, which occurs mainly in eastern Asia, particularly in China. Although several taxonomic systems have been proposed, there is still much debate on the delimitation and systematic arrangement of the species within the genus, due mainly to high variation in morphology, habitats, phenotypic plasticity, and potential hybridization. *A. lobophylla* Hong is a rare perennial endemic to several counties of Sichuan, China. Since this species was recognized, much work has been done on its taxonomic status, including morphology, crossing experiment and allozymes. However, evidence available is not concordance so far, and its relationship with other species within the genus remains largely uncertain. In the present paper, the internal transcribed spacer(ITS) region of 18s～26s nuclear ribosomal DNA was sequenced in 10 representatives of *Adenophora* and two outgroup species of *Campanula* to assess its utility for phylogenetic reconstruction in *Adenophora*, in addition to reevaluation of the taxonomic status of *A. lobophylla*. The results indicate that there exist high sequence alignability and length conservation among ITS sequences, with informative sites being 3.9% and length ranging from 539 to 541 bp and G + C content varying from 57% to 60%. Phylogenetic

* 国家自然科学青年基金(39600009)和中国科学院生物多样性世界银行贷款(BRIM)资助项目。
在取材和实验过程中，承蒙美国密苏里植物园朱光华博士和本室丁开宇先生以及美国华盛顿大学 R. Jason, D. Hayworth, K. Olson, A. Smith 诸位先生的帮助，谨此一并致谢。
1997-03-31 收稿。

analyses using Fitch parsimony show that *A. lobophylla* is closely related to *A. himalayana instead of A. potaninii* or *A. stenanthina* as revealed by previous morphological work and crossing experiment. The ITS phylogeny is generally congruent with other evidence in that *A. lobophylla* should be removed from the *A. potaninii* complex or even subsect. Microdiscus. Its appropriate placement, however, should be further explored. In pairwise comparisons at unambiguously aligned sites, sequence divergence was relatively low among *Adenophora* species with the values ranging from 0.0 to 3.9% in spite of the fact that the species surveyed covered all of the sections and subsections of the genus. In contrast, high sequence divergence is found among *Adenophora* and *Campanula* species with the values from 17.8% to 19.2%. The low divergence among *Adenophora* species is justified considering its recent origin, and also suggests that ITS sequence would provide a promising source of nuclear phylogenetic markers to reconstruct the phylogeny within Campanulaceae on the tribe and family levels.

Key words *Adenophora lobophylla*; Internal transcribed spacers (ITS); Phylogeny; *Adenophora*

摘要 本文采用PCR直接测序方法，对来自沙参属全部2组7亚组的10个种和作为外类群的风铃草属2个种的核糖体DNA ITS片段进行了序列分析。在重点探讨裂叶沙参分类地位的同时，分析了ITS片段序列在沙参属系统发育重建中的价值。结果表明，在沙参属中，ITS片段在长度、GC含量和位点变异量上均比较一致；长度539 bp～541 bp，GC含量57%～60%，信息位点只占总位点的3.9%。采用PAUP软件进行的系统发育分析表明，裂叶沙参 *A. lobophylla* 与大花盘亚组的 *A. himalayana* 组成一支，而不是象以往形态学和杂交试验所推断的与泡沙参 *A. potaninii* 或 *A. stenanthina* 近缘。可见，ITS序列进一步支持将裂叶沙参移出泡沙参复合体甚至移出有齿亚组的推论，但同时也表明将其作为 *A. stenanthina* 的近缘种是不适宜的。尽管本研究所测定的类群已涵盖了整个沙参属，但种间序列的两两比较表明，沙参属种间在ITS片段上的分化很小(0.0～3.9%)，相比之下，沙参属类群与风铃草属类群间的分化却很高(17.8%～19.2%)。这大概和沙参属起源较晚、遗传分化较小有关。本文还就ITS片段在沙参属和桔梗科系统学研究中的价值进行了讨论。

关键词 裂叶沙参；nrDNA ITS；分类地位；沙参属

裂叶沙参 *Adenophora lobophylla* Hong 隶属桔梗科 Campanulaceae 沙参属，是仅见于我国四川西北马尔康、金川、丹巴县境内的一个稀有种(洪德元，1983)。近年来有调查表明，该种已从过去的许多分布点上消失，处于濒危状况(张文辉，1995[①])。由于发表该种时所依据的标本十分有限，一些形态特征的考查受到限制，洪德元(1983)将其放在沙参组 Sect. Microdiscus Fed. 有齿亚组 Subsect. Microdiscus 内，并认为与泡沙参 *A. potaninii* 最近缘，同属一个复合体。近年来，通过对泡沙参复合体的进一步研究表明，该种在许多形态特征(包括花部、叶片和花序分枝等)和生境特点等方面明显不同于泡沙参(张文辉，1995[①]；葛颂，洪德元，1994)。在进一步的杂交试验中，我们发现裂叶沙参与泡沙参复合体成员之间的生殖隔离已十分充分而与该属另一个组——筒花组的成员 *A.*

①张文辉，1995. 裂叶沙参种群动态与濒危机制的研究. 博士学位论文。

stenanthina 之间有很高的亲缘关系 (Ge & Hong, 1994)。显然，将该种放在泡沙参复合体内是不适宜的，能否放在有齿亚组甚或沙参组也有待进一步探讨。然而，由于沙参属形态变异大且不稳定，性状变异的相关性不强，而且花粉和染色体等的资料在确定该属种间关系上的价值不大，再加上前述的杂交试验所用对照种不够，因此仍无法对该种的系统位置作出可靠的推断。有鉴于此，采用 DNA 水平上的分子标记来探讨该种的系统位置不失为一种有益的尝试。

核糖体 DNA 是编码核糖体 RNA 的基因，在植物细胞核中以重复连续排列的方式存在，每个细胞中的拷贝数目在 1,000 至 10,000 之间。由于核糖体 DNA 中包含了进化速度不等的编码区、非编码转录区和非转录区，因而可以选取其中保守程度不同的片段用于不同的系统发育和进化研究(Baldwin *et al*., 1995; Schaal & Learn, 1988)。ITS(Internal transcribed spacers)是核糖体 DNA 中介于 18s 和 5.8s 之间(ITS1)以及 5.8s 和 26s 之间(ITS2)的非编码转录间隔区。由于ITS存在于高重复的核糖体DNA中，进化速度快且片段长度不大(在被子植物中小于700bp)，加上协调进化(concertedevolution)使该片段在基因组不同重复单元间十分一致，因而十分适于进行各种分子操作，成为广泛应用于被子植物系统发育和进化研究的核基因标记(Baldwin *et al*., 1995; Campbell *et al*., 1995; Sang *et al*., 1995; Wendel *et al*., 1995; Kim & Jansen, 1994; Baldwin, 1993; Porter, 1993)。尤其是近些年来，建立在 PCR 基础上直接测序方法的建立和广泛应用，ITS 序列分析已成为在序列水平上探讨科内属间及属下种间关系十分有效的手段(Yuan *et al*., 1996; Sang *et al*., 1994; Baldwin, 1993; Ritland *et al*., 1993; Soltis & Kuzoff, 1993)。

本研究采用直接 PCR 测序方法，对裂叶沙参以及来自沙参属全部 2 组和 7 亚组的 10 个代表种进行了核糖体 DNA ITS 片段的一级序列分析，结合形态学和杂交试验等证据，对裂叶沙参的系统位置进行了探讨。与此同时，根据来自该属不同组和亚组代表种的 ITS 序列，初步分析了该片段序列资料在沙参属系统发育研究中的价值，为进一步采用该片段来探讨该属的分类系统和进化奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料来源

本实验材料除裂叶沙参以外，还包括来自沙参属全部 2 组 7 亚组的 9 个种以及风铃草属 *Campanula* L. 的 2 个种(作为外类群)。根据洪德元(1983)系统，沙参属 10 个种的分类地位见表 1。试材除台湾沙参以外，均取自试验地内移栽或野外活体植株的新鲜叶片。分单株采集的叶片均用硅胶快速干燥并保存于-20℃ 备用。台湾沙参的叶片采自美国密苏里植物园标本馆(MO)的腊叶标本。样品来源及凭证详见表 1。

1.2　总 DNA 提取

总 DNA 提取依照 Doyle & Doyle(1987)的 CTAB 方法略加简化进行，具体步骤如下：从每个类群中选 1～2 个个体进行测序，取硅胶干燥或采自标本上的供试叶片半片(约 2 cm^2)，混合 2～3 倍体积石英砂，置 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中充分研磨，然后加入 700 μL 含 0.3%β-巯基乙醇的 2XCTAB 提取液，混匀，于 65℃ 水浴 20 min。加入 700 μL 氯仿-异戊醇(24:1)混合液，轻轻摇匀后 10, 000 rpm 离心 5 min，收回的上层水

相再加入2/3体积的异丙醇置于室温下10 min，然后10,000 rpm离心5 min，弃上清液，用70%乙醇洗涤1～2次，风干后加入50～100 μL 1XTE重悬DNA，置4℃备用。

表1 用于核糖体DNA ITS序列测定的类群、分类地位、样品来源及其凭证

Table 1 Taxa, origins and taxonomic status of *Adenophora* species and outgroups (*Campanula*) included in nrDNA-ITS sequence analyses

Taxa	Origin	Collection No. or Voucher	Taxonomic status[1)]
A. divaricata	Baihua Mt., Beijing	GS-11	Ⅱ-5
A. himalayana	Daufu County, Sichuan	HDY-95065	Ⅱ-6
A. lobophylla	Jinchuan County, Sichuan	GS-301	Ⅱ-4
A. morrisonensis[2)]	Hualien Hsien, Taiwan	Hsiu-lan Ho 1214	Ⅱ-1
A. paniculata	Baihua Mt., Beijing	GS-01	Ⅰ
A. petiolata	Longxian County, Shaanxi	GS-G9514	Ⅱ-3
A. potaninii(*a*)	Barkam County, Sichuan	GS-G9518	Ⅱ-4
A. potaninii(*b*)	Maoxian County, Sichuan	GS-G9518	Ⅱ-4
A. stenanthina	Ningwu County, Shanxi	GS-G9501	Ⅰ
A. stricta(*a*)	Danfeng County, Shaanxi	GS-G9518	Ⅱ-2
A. stricta(*b*)	Baoxing County, Shaanxi	GS-G9518	Ⅱ-2
A. wawreana	Xiangshan Mt., Beijing	GS-G01	Ⅱ-4
C. glomerata	Jianchang County, Liaoning	DKY-9601	
C. punctata	Wuling Mt., Beijing	H96173	

GS = Ge Song; HDY = Hong De-yuan *et al.*; DKY = Ding Kai-yu.

1) 根据洪德元(1983)系统，罗马数字代表组，其后的阿拉伯数字代表亚组。

2) 叶片取自美国密苏里植物园标本馆(MO).

1) The taxonomic system is based on Hong(1983), the Roman numerals indicate sections and Latin numerals, subsections.

2) Leaf materials were collected from the herbarium of Missouri Botanical Garden(MO), USA.

1.3 核糖体DNA ITS片段PCR扩增和产物纯化

采用标准的双链PCR反应扩增核基因组的整个ITS片段(5′18s～3′26s)。采用的引物为位于18s上的ITS1～18 (5′-CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG-3′)和位于26s上的ITS4(5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′)。50 μL反应体积含：29 μL双蒸水，5 μL 10XTris-HCl缓冲液 (pH9.2, 25 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$)，5 μL (8 mmol/L) dNTP，各5 μL (2 μmol/L)的引物ITS1-18和ITS4，0.2 μL (Unit/μL) Taq酶以及1 μL模板溶液。扩增条件为:94 ℃预变性1 min，接以94℃ 1 min，48℃ 1 min 10 s，72℃ 1 min 10 s，循环30次，最后在72℃保温10 min。扩增得到的PCR产物经用Geneclean方法(Bio 101, La Jolla, California)纯化后即可直接作为序列测定的模板。

1.4 ITS测序

采用^{32}P延伸标记法在手动式序列分析仪上进行直接PCR测序，测序试剂盒为Promega公司的fmol™ DNA sequencing system。测序用引物除了ITS1-18和ITS4以外，补充位于5.8s上的ITS2 (5′-GCT ACG TTC TTC ATC GAT GC-3′)和ITS3(5′-GCA TCG ATG AAG AAC GTA GC-3′)从而使ITS-1和ITS-2两个片段均得到正向和逆向序列结果，以保证序列测定的精度。测序PCR扩增的条件为：95℃预变性3 min，接以94℃ 20 s，54℃ 1 min 10 s，72℃ 1 min，循环25次，最后置于4℃保存。完成序列胶电泳后，将凝胶转移至3 mm Whatman滤纸上，于80℃真空干燥1 h，然后加压X射线胶

片放射自显影 18～24 h。

1.5 序列数据的处理

根据在近缘类群中已有报道的序列资料 (Sang *et al*., 1994; Baldwin, 1992), 确定核糖体 DNA 两个非编码转录间隔区(ITS-1 和 ITS-2)和 3 个编码区(18s, 5.8s 和 26s 基因) 的界线。由于最大的空位(gap)只含两个碱基, 故所有类群 ITS 序列的排序(alignment) 可很容易地通过手工完成。运用 PAUP 3.1.1 系统发育分析程序进行序列数据的各种处理(Swofford, 1993)。根据随机树的树长的分布确定序列数据中所含系统发育信号的强弱(Hillis & Huelsenbeck, 1992)。以 Fitch 简约原则(性状处理为无序) 采用分支界线 (Branch-and-Bound)搜索法寻找最简约的一致树(consensus tree)。一致树各分支的置信度用靴带(bootstrap)分析法进行检验, 共进行 1,000 次循环。

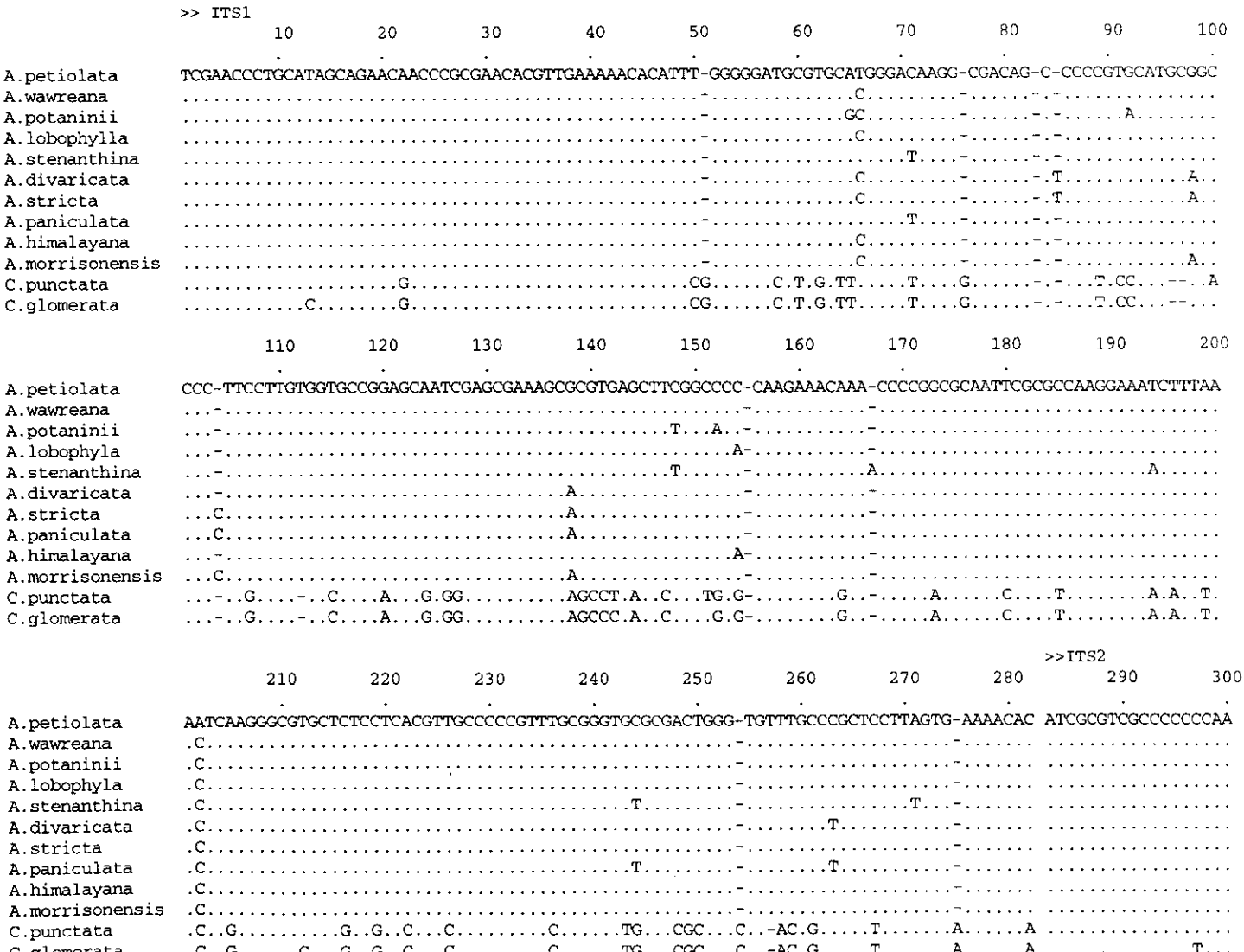
2 结　果

2.1 ITS 片段的长度和变异

本研究共测定了 12 个类群(包括两个外类群) 的整个 ITS 区(包括 ITS-1, 5.8s 和 ITS-2)。由于所有类群(包括外类群)5.8s 的长度均为 155 bp 且高度保守(只有一个变异位点), 故不作进一步分析。12 个类群的全部 ITS 序列详见图 1, 有关序列长度, GC 百分含量及类群序列之间的分化详见表 2。其中对 *A. potaninii*, *A. stricta* 均测定了来自不同居群的两个个体(表 1), 但所得序列完全一致。由表 2 可见, 如不考虑外类群, 沙参属各类群间在 ITS 序列上的差异(分化)很小。序列长度只有 2 个碱基的差别, 空位只涉及一个碱基(但在外类群中出现了涉及两个碱基的空位, 见图 1 中第 96～97 位和 539～540 位), GC 含量在 57%～60%之间。总的变异位点占 5.7%, 信息位点占 3.9%(有关变异位点和信息位点的含义见表 2 注解)。沙参属类群间的序列分化仅为 0.0～3.4%(表 2)。相比之下, 沙参属类群和风铃草类群间的序列分化很大, 达 17.8%～19.2%; 而风铃草 2 个类群间的分化也很小, 为 2.0%(数据未列)。

2.2 ITS 序列的系统发育分析

根据图 1 的序列资料, 将 ITS-1 和 ITS-2 作为一个共同数据矩阵进行 PAUP 运算。将空位分别处理为数据丢失(missing)和新状态(new state)均只得到一个相同的最简约系统树, 见分支图(图 2)和系统发育分支图(图 3)来表示。分支图的总长度为 132 步, 一致性指数 CI=0.977, 保持性指数 RI=0.976。接近于 1 的 CI 和 RI 值说明整个系统树的可靠性是很高的。由 10,000 个随机树的步长分布图(图 4)可见, 随机树的树长分布呈明显的偏态, 表明由该数据矩阵得到的系统树的树长分布是非随机的。根据 Hillis & Huelsenbeck (1992) 方法计算出的 g1 统计量为-4.606, 统计检验达极显著水平($p<0.001$)。明显偏态的树长分布和统计极显著的 g1 值说明此数据矩阵含有可靠的系统发育信号。靴带分析结果进一步表明, 分支图中各分支均得到比较高的支持, 置信度最低的为 60%, 最高的达 100%(图 2)。除 *A. stricta*, *A. divaricata* 和 *A. morrisonensis* 一支出现多歧分支(polytomy)以外, 本研究中的所有类群均能被分辨开来。尽管这 3 个种构成单系的支持率高达 87%, 但多歧分支的出现说明 ITS 序列数据无法分辨 *A. stricta*, *A. divaricata* 和 *A. morrisonensis* 这 3 个种的种间关系。


>> ITS1
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
A.petiolata TCGAACCCTGCATAGCAGAACAACCCGCGAACACGTTGAAAAACACATTT-GGGGGATGCGTGCATGGGACAAGG-CGACAG-C-CCCCGTGCATGCGGC
A.wawreana
A.potaninii
A.lobophylla
A.stenanthina
A.divaricata
A.stricta
A.paniculata
A.himalayana
A.morrisonensis
C.punctata
C.glomerata
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
A.petiolata CCC-TTCCTTGTGGTGCCGGAGCAATCGAGCGAAAGCGCGTGAGCTTCGGCCCC-CAAGAAACAAA-CCCCGGCGCAATTCGCGCCAAGGAAATCTTTAA
A.wawreana
A.potaninii
A.lobophyla
A.stenanthina
A.divaricata
A.stricta
A.paniculata
A.himalayana
A.morrisonensis
C.punctata
C.glomerata
>>ITS2
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
A.petiolata AATCAAGGGCGTGCTCTCCTCACGTTGCCCCCGTTTGCGGGTGCGCGACTGGG-TGTTTGCCCGCTCCTTAGTG-AAAACAC ATCGCGTCGCCCCCCCAA
A.wawreana
A.potaninii
A.lobophyla
A.stenanthina
A.divaricata
A.stricta
A.paniculata
A.himalayana
A.morrisonensis
C.punctata
C.glomerata

```
                    310        320        330        340        350        360        370        380        390        400
                    .          .          .          .          .          .          .          .          .          .
A.petiolata         GCATCTTGCACCTCCAAGTGCCCGCTTGCTTGGTGGGGAGCGTACATTGGCCTCCCGTGCCTCGCAGTTCGGTTGGCTCAAAATGGAGTCCCCTGTGAAG
A.wawreana          ..........................................................T.....................................................
A.potaninii         ..........................................................T.....................................................
A.lobophylla        ............T.....................................................................................................
A.stenanthina       ....................T.....T.....................................AT.....................................................
A.divaricata        ....................................................................................................................
A.stricta           ....................................................................................................................
A.paniculata        ....................T.....T.....................................AT.....................................................
A.himalayana        ............T.....................................................................................................
A.morrisonensis     ....................................................................................................................
C.punctata          A..CTGA.....CAG-.....T.T..G.............G.................TT.G.CG...C.........C.T.........C.T..
C.glomerata         A..CTGA......AG-.....T.TG.G.............G.T...............TT.G.CG...C.........C.T.........C.T..

                    410        420        430        440        450        460        470        480        490        500
                    .          .          .          .          .          .          .          .          .          .
A.petiolata         GACGCACGACAAGTGGTGGTTGATAATAAGGCCCTCGCGTTCTGTCGTGCTTGAATCCTTTGCGGGTTTTGGCTC-TTCGATTAA-TGACCCTGATGACA
A.wawreana          ....................T.....-...................................................-.........-.............G
A.potaninii         ....................T.....-...................................................-.........-.............G
A.lobophyla         ....................T.....................................................-.........-.............G
A.stenanthina       ..T.....................................................C.....................-.........-.............G
A.divaricata        ....................................................................................-.........-.............G
A.stricta           ........................{.....................................T.....-.........-.............G
A.paniculata        ..T.....................................................C.....................-.........-.............G
A.himalayana        ....................T.....................................................-.........-.............G
A.morrisonensis     ....................................................................................-.........-.............G
C.punctata          ........................C.............C.C........G.......CC.....A.........-G..-.C-..G.............G
C.glomerata         ........................C.............C.C........G.......CC..C..A.........-G..-.C-..G.............G

                    510        520        530        540        550
                    .          .          .          .          .
A.petiolata         CGCCTTCACAATCGCACCCTAGTGGTGGTTGATGGTGGAGACGTGCTCCGA
A.wawreana          ..................................................T...
A.potaninii         ........................................C.........T...
A.lobophyla         ..................................................T...
A.stenanthina       ....................................................
A.divaricata        ..................................................T...
A.stricta           ..................................................T...
A.paniculata        ....................................................
A.himalayana        ..................................................T...
A.morrisonensis     ..................................................T...
C.punctata          .A.....G.G...C..TG.AT.......CC....A...--TT.C.......
C.glomerata         .A.....G.G.C.C..TG.AT.......CC....A...--TT.C.......
```

图 1　沙参属 10 个种和风铃草属 2 个种排序后的 ITS 序列。横线代表空位，圆点代表与第一个类群相同的碱基。

Fig. 1　Aligned ITS sequences from 10 *Adenophora* and 2 *Campanula* species. Bars indicate the gaps and dots indicate matched sequences to the first taxon.

表 2 沙参属类群 ITS 序列及其分化
Table 2 ITS sequences and their divergence of *Adenophora* sepecies

	ITS-1	ITS-2	Total
序列长度 (Length (bp))	272～275	263～266	539～541
变异位点数目(No. variable sites) *	17	14	31(5.7%)
信息位点数目(No. informative sites) *	10	11	21(3.9%)
种间平均分化 (Mean divergence)	0.0～3.8%	0.0～4.0%	0.0～3.9%
GC 百分含量 (G+C content(%))	58～61	56～60	57～60

* 变异位点 (variable site) 为出现两种以上碱基类型的位点；而信息位点(informative site) 为特殊的变异位点，即在该位点上不仅存在两种以上的碱基类型，而且每种碱基类型均出现在两个以上的类群中。

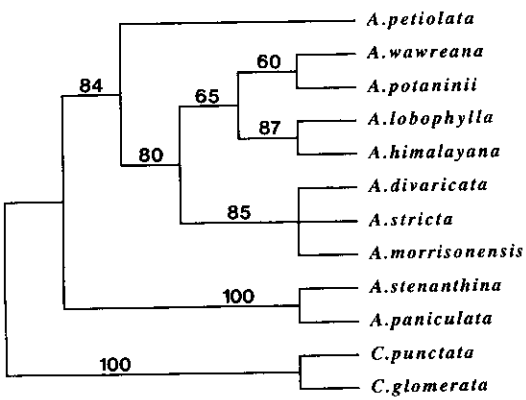


图 2 根据 ITS 序列所得到的最简约系统树 分支上的数字代表该分支靴带 (bootstrap)分析的百分比。
Fig. 2 The most parsimonious tree generated from ITS sequences Numbers above the branches are bootstrap percentage values.

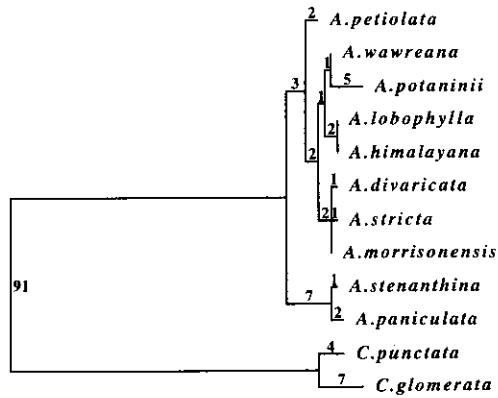


图 3 根据 ITS 序列所得到的最简约的系统发育分支图 分支上数字代表碱基替换的数目。
Fig. 3 Phylogram of the single most-parsimonious tree Numbers above the branches indicate the number of substitutions.

从 ITS 系统树(图 2 和图 3)可以发现，沙参属和风铃草属之间的分化已十分明显，各自成为单系类群的支持率达 100%。对沙参属来说，ITS 序列可分辨出 5 支。*A. stenanthina* 和 *A. paniculata* 为简花组成员(表 1 中以 I 代表)，自成一支，支持率达 100%。其余 8 个种均为沙参组成员(表 1 中以 II 代表)，除有齿亚组包括 3 个种以外(*A. potaninii*, *A. wawreana* 和 *A. lobophylla*)，其余 5 个种各自代表一个亚组(表 1)。裂叶沙参(*A. lobophylla*)与大花盘亚组(subsect. Microdiscus)的 *A. himalayana* 成为一支，靴带分析的支持率达 85%。

3 讨 论

3.1 裂叶沙参的系统位置

裂叶沙参 *A. lobophylla* 和 *A. potaninii*, *A. wawreana* 曾被作为同一个复合体的成员。在本研究中，这三个类群出现在两个不同的分支中，*A. potaninii*, *A. wawreana* 仍构成一支，而裂叶沙参则与另一个亚组成员 *A. himalayana* 构成一支，且得到很高的靴带分析支持率(87%)。裂叶沙参与 *A. potaninii* 和 *A. wawreana* 不构成一个单系并

不奇怪，这和以往来自形态学(张文辉，1995[①]；葛颂，洪德元，1994)、杂交试验(Ge & Hong，1994)以及等位酶(葛颂等，待发表)的研究结果是相似的，即裂叶沙参与泡沙参复合体的成员分化较大。但值得注意的是，裂叶沙参与大花盘亚组的唯一成员 *A. himalayana* 构成一支，且二者的序列完全一致(图 2 和图 4)，而不是象杂交试验及花部形态学所推断的与筒花组成员相似(Ge & Hong，1994)。由于在前述的杂交试验中我们只选取了一个采自泡沙参复合体以外的类群(即 *A. stenathina*)，其结果对确定裂叶沙参的分类地位价值有限。通过本研究对 ITS 序列的比较结果看，裂叶沙参与筒花组成员 *A. stenanthina* 的关系似乎较远而仍应放在沙参组中。然而，裂叶沙参在形态学上与 *A. himalayana* 并不十分相似，如前者花萼片较长且具齿，椭圆形叶片半裂且具长柄等，因此能否将其看成是 *A. himalayana* 的近缘种还无法确定。另外的一种可能，就是该种起源于杂交，亲本之一是 *A. himalayana*。为此，我们还需要进行进一步深入的研究，包括涉及更多类群的杂交试验、形态学观测以及其它的分子生物学证据。

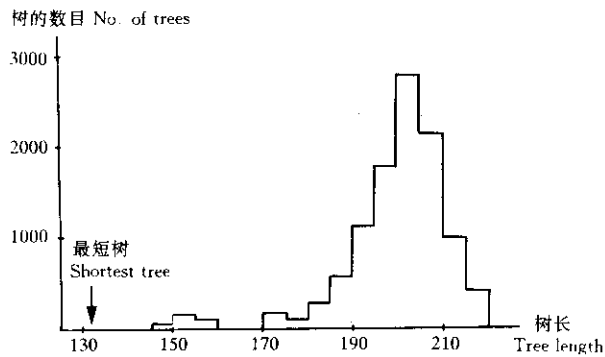


图 4　ITS 序列数据的树长分布图
Fig. 4　Tree length distribution from the ITS data set

3.2　ITS 序列资料在沙参属系统学研究中的价值

植物系统学家认识到 ITS 序列分析的优点并将其应用于被子植物系统学研究不过才短短几年，但迄今已积累了大量的资料，取得了可喜的成绩。Baldwin 等(1995)分析了该片段在 22 个被子植物科中的应用情况，结果表明该片段在不同的植物类群中可用来解决科内不同等级的系统发育和分类问题，包括科的界限和科内属间关系、属下分类系统、近缘种关系甚至种下等级的划分(见 Baldwin *et al.*，1995)。此外，ITS 序列也是探讨网状进化和物种形成等进化机制的有力证据(Baldwin *et al.*，1995；Sang *et al.*，1995；Wendel *et al.*，1995；Kim & Jansen，1994)。然而，在不同的植物类群以及在不同分类等级上，ITS 序列资料的价值是不一样的，因为不同类群的起源时间及进化(分化)速率不一样，其 ITS 序列所含有的信息量也不同。例如，在对花葱科 Polemoniaceae 19 个属的研究中，ITS 序列信息位点的比例可达 52%（Porter，1993），而在对 Fouquieriaceae 科 *Fouquieria* 属 11 个种的研究中，信息位点的比例只有 6%（Schultheis & Baldwin，1994)。另一方面，Baldwin(1993)在菊科 *Calycadenia* 属的一个种内就检测出了3.7%的信息位点。相比之下，沙参属 ITS 序列上的变异量很小，信息位点只占 3.9%（表 2)，尽管本研究的取样已覆盖了整个沙参属。在本研究的后续工作中，我们进一步加大了取样密度，完成 ITS 序列的类群数目已达 25 个，但所获得的信息位点百分比只提高了不到 2 个百分点(5.7%)(葛颂等，待发表)。从图 3 的系统发育分支图上也可看出，沙参属

①张文辉，1995. 裂叶沙参种群动态与濒危机制的研究. 博士学位论文。

类群间的碱基差异很小，属内差异最大的组间也只有10个碱基替换，亚组间的差异就更小了。相比之下，沙参属与风铃草属之间有91个碱基替换，差异很大。出现这种情况的原因大概和沙参属起源晚、种间遗传分化很小有关。因此，由于ITS序列在沙参属植物中相对较为保守，在探讨近缘种的关系时，分辨率不够，作用不大，这也是出现多歧分支的原因之一，如图2和图3中来自3个不同亚组的 *A. stricta*，*A. divaricata* 和 *A. morrisonensis* 无法被分辨开来。

另一方面，在ITS序列含有较高变异信息的同时，还应测定这些变异信息中噪音干扰的程度或系统发育信号的强弱。前述的随机树树长分布图及其相应的g1统计法（Hillis & Huelsenbeck, 1992)就是其中重要的方法。尽管沙参属植物ITS序列所含信息位点比率较低，但仍具有较强的系统发育信号(图3)，因而在探讨属下组或亚组的划分上具有一定的参考价值。同时，ITS片段在沙参属中较为保守意味着该片段序列在揭示桔梗科科内或族内系统发育关系及近缘属的关系方面具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

洪德元,1983. 桔梗科. 中国植物志. 第73卷第2分册. 北京：科学出版社

葛颂，洪德元，1994. 泡沙参复合体的物种生物学研究(一) 表型的可塑性. 植物分类学报，32(6)：489～503

Barranov A I, 1963. Materials to the monograph of the species of *Adenophora* of N.E. China. Quart J Taiwan, 16: 143～179

Baldwin B G, 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. Molec Phylogenetic Evol, 1:3～16

Baldwin B G, 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. Amer J Bot, 80:222～238

Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M *et al.*, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard, 82:247～277

Campbell C S, Donoghue M J, Baldwin B G *et al.*, 1995. Phylogenetic relationships in *Maloideae* (Rosaceae): Evidence from sequences of internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and congruence with morphology. Amer J Bot, 82:903～918

Doyle J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. Phytochem Bull, 19:11～15

Ge S, Hong D Y, 1994. Biosystematic studies on *Adenophora potaninii* Korsh. complex (Campanulaceae) Ⅱ. Crossing experiment. Cathaya, 6:15～26

Hillis D M, Huelsenbeck J P, 1992. Signal noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. J Hered, 83:189～195

Kim K-J, Jansen R K, 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Pl Sys Evol, 190:157～185

Porter J M, 1993. Phylogeny of Polemoniaceae based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. Amer J Bot, 80(supplement,"abstract):171

Ritland C E, Ritland K, Straus N A, 1993. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimiulus guttatus* species complex. Molec Biol Evol, 10:1273～1288

Sang T, Crawford D J, Kim S-C *et al.*, 1994. Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (Asteraceae) on the Juan Fernandez Islands: Evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. Amer J Bot, 81:1494～1501

Sang T, Crawford D J, Stuessy T F, 1995. Documentation of reticulate evolution in Peonies (*Paeonia*) using

internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 92:6813～6817

Schaal B A, Learn G H, 1988. Ribosomal DNA variation within and among plant populations. Ann Missouri Bot Gard, 75:1207～1216

Schultheis L M, Baldwin B G, 1994. Molecular systematics of Fouquieriaceae: Evidence from nulear rDNA ITS studies. Amer J Bot, 81(supplement, abstract):199

Soltis P S, Kuzoff R K, 1993. ITRS sequence variation within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. laevigatum*. Molec Phulogenetics Evol, 2:166～170

Swofford D L, 1993. PAUP: phylogenetc analysis using parsimony. version 3.1.1. Computer software. Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois

Tsoong P C, 1935. Preliminary study on Chinese Campanulaceae. Contr. Inst. Bot Nat Acad Peiping, 3: 66～83

Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T, 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolypoid speciation in cotton (*Gossypium*). Proc Natl Acad Sci USA, 92:280～284

Yuan Y-M, Kupfer P, Doyle J J, 1996. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nulcear ribosomal DNA. Amer J Bot, 83:641～652